

明 細 書

無細胞系タンパク質合成におけるミクロソーム膜添加による翻訳後修飾方法

技術分野

本発明は、無細胞系タンパク質合成方法、特に翻訳後修飾が行なわれ得る無細胞系タンパク質合成方法に関する。

背景技術

タンパク質の構造や機能を解析する上で、タンパク質の大量生産は不可欠な技術である。しかしながら、大腸菌をはじめとする数多くの生細胞を用いた発現系は、その生物の生命維持に支障となるタンパク質を合成することは事実上困難であり、限られたタンパク質のみの取得・解析しか行われてこなかった。これに対し、無細胞系タンパク質合成は、タンパク質合成に必要な装置のみを取り出した人工的なタンパク質合成に特化した系であるので、生細胞の発現系の抱える問題点を解決し得る手法であると期待されている。

また、ゲノム解析の進展に伴い、生体内に存在するすべてのタンパク質の構造と機能の網羅的な解明をめざしたプロテオーム解析が進行している。生体内のタンパク質は、細胞質に存在する遊離のリボソーム上で翻訳が開始した後、ほぼ例外なく翻訳中あるいは翻訳後にプロテアーゼによるプロセッシングや、特定のアミノ酸残基の修飾といった翻訳後修飾を受ける。これらの翻訳後修飾は、多くの場合タンパク質の機能発現やその制御に直接関与することから、これらの解析はタンパク質機能の解明に不可欠である。

一般的な無細胞系タンパク質合成法としては大腸菌溶解液、小麦胚芽抽出液、ウサギ網状赤血球溶解液等が知られているが、高等動物・植物で生じる主要な翻訳後修飾能をもつタンパク質合成系としては、ウサギ網状赤血球溶解液に犬脾臓

本発明は、上記課題を解決するためになされたものであり、その目的とするところは、無細胞系タンパク質合成における新規な翻訳後修飾方法ならびに当該翻訳後修飾反応を利用した新規な無細胞系タンパク質合成方法を提供することである。

発明の概要

本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は以下のとおりである。

(1) 無細胞系タンパク質合成用抽出液を用いる無細胞系でのタンパク質合成方法であって、翻訳反応を節足動物由来のミクロソーム膜の存在下で行うことを含む方法。

(2) mRNA濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) と節足動物由来のミクロソーム膜の濃度 (A_{260}) との比が1:0.1~5で翻訳反応を行う上記(1)に記載の方法。

(3) 当該比が1:0.3~2.3である、上記(2)に記載の方法。

(4) 節足動物由来のミクロソーム膜が昆虫組織から抽出されたものである、上記(1)~(3)のいずれかに記載の方法。

(5) 昆虫組織がカイコ組織である、上記(4)に記載の方法。

(6) カイコ組織が脂肪体である、上記(5)に記載の方法。

(7) 節足動物由来のミクロソーム膜が昆虫培養細胞から抽出されたものである、上記(1)~(3)のいずれかに記載の方法。

(8) 昆虫培養細胞が *Trichoplusia ni* 卵細胞由来あるいは *Spodoptera frugiperda* 卵巣細胞由来の培養細胞である、上記(7)に記載の方法。

(9) 無細胞系タンパク質合成用抽出液が、節足動物由来の抽出物を含有するものである、上記(1)~(3)のいずれかに記載の方法。

(10) 節足動物由来の抽出物が昆虫組織から抽出されたものである、上記(9)

上記（２０）～（２２）のいずれかに記載の方法。

（２４）昆虫組織がカイコ組織である、上記（２３）に記載の方法。

（２５）カイコ組織が脂肪体である、上記（２４）に記載の方法。

（２６）節足動物由来のミクロソーム膜が昆虫培養細胞から抽出されたものである、上記（２０）～（２２）のいずれかに記載の方法。

（２７）昆虫培養細胞が *Trichoplusia ni* 卵細胞由来あるいは *Spodoptera frugiperda* 卵巣細胞由来の培養細胞である、上記（２６）に記載の方法。

（２８）無細胞系タンパク質合成用抽出液が、節足動物由来の抽出物を含有するものである、上記（２０）～（２２）のいずれか１項に記載の方法。

（２９）節足動物由来の抽出物が昆虫組織から抽出されたものである、上記（２８）に記載の方法。

（３０）昆虫組織がカイコ組織である、上記（２９）に記載の方法。

（３１）カイコ組織がカイコ幼虫の後部絹糸腺を少なくとも含有する、上記（３０）に記載の方法。

（３２）節足動物由来の抽出物が昆虫培養細胞から抽出されたものである、上記（２８）に記載の方法。

（３３）昆虫培養細胞が *Trichoplusia ni* 卵細胞由来あるいは *Spodoptera frugiperda* 卵巣細胞由来の培養細胞である、上記（３２）に記載の方法。

（３４）無細胞系タンパク質合成用抽出液が、小麦胚芽由来の抽出物を含有するものである、上記（２０）～（２２）のいずれかに記載の方法。

（３５）無細胞系タンパク質合成用抽出液が、哺乳動物培養細胞由来の抽出物を含有するものである、上記（２０）～（２２）のいずれかに記載の方法。

（３６）無細胞系タンパク質合成用抽出液が、ウサギ網状赤血球由来の抽出物を含有するものである、上記（２０）～（２２）のいずれかに記載の方法。

来 (S f 2 1 MM)) 存在下、あるいは非存在下でタンパク質合成を行い、グリコシル化が行われているか否かを調べた結果を示す図である。

発明を実施するための形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は、無細胞系タンパク質合成用抽出液を用いる無細胞系でのタンパク質合成方法であって、翻訳反応を節足動物由来のミクロソーム膜の存在下で行うことを特徴とする。

無細胞系タンパク質合成方法は、通常、翻訳装置としてのリボソームなどを含有する生体由来抽出物を含有する無細胞系タンパク質合成用反応液に、転写鋳型または翻訳鋳型を添加して行う。翻訳鋳型としては、鋳型DNAから転写して得られたmRNAであってもよい。

本発明に使用される無細胞系タンパク質合成用反応液に含まれる抽出物は、翻訳鋳型を翻訳して該鋳型にコードされるタンパク質を生成させ得るものであれば如何なるものであってもよく、従来公知の大腸菌、コムギ、オオムギ、イネ、コーン等のイネ科の植物、及びホウレンソウなど植物種子の胚芽、ウサギ網状赤血球などから抽出された抽出物、抽出液を特に制限なく使用することができる。これらは市販のものをを用いることもできるし、それ自体既知の方法、具体的には、大腸菌、小麦胚芽またはウサギ網状赤血球由来の抽出液の場合には、「生物化学実験法43、遺伝子発現研究法」(学会出版センター)に記載の方法等に準じて調製することもできる。市販のタンパク質合成用細胞抽出液としては、大腸菌由来ではRTS100 E. coli HY Kit (ロシュ・ダイアグノスティック社製) などが挙げられ、ウサギ網状赤血球由来ではRabbit Reticulocyte Lysate System, Nuclease Treated (プロメガ社製) など、コムギ胚芽由来ではPROTEIOS set (東洋紡績社製) などが挙げられる。さらに酵母由来の抽出液は、Gasiorらの

する。カイコは、卵より孵化した後の幼虫の状態では、桑を食べて発育する期間（齡）と、食わずに脱皮の準備をする期間（眠）を交互に繰り返す。カイコの幼虫において、孵化してから1回目の脱皮までを1齡期、1回目の脱皮から2回目の脱皮までを2齡期といい、通常、4回脱皮して5齡期で成熟する（この成熟した状態のカイコ幼虫は「熟蚕」とも呼ばれる）。カイコの幼虫は、熟蚕になると体が透明になり絹糸を吐いて繭を形成し、蛹化する。蛹の後、羽化して成虫となる。

無細胞系タンパク質合成用反応液がカイコ組織由来の抽出物を含有する場合、組織としてはカイコの一生のうちのどの状態（卵、幼虫（1齡期～5齡期）、蛹、成虫）のいずれの組織であってよい。またカイコ組織は、単一の状態における単一の組織（たとえば、5齡期のカイコ幼虫における後部絹糸腺のみ）に限らず、単一の状態における複数の組織（たとえば、5齡期のカイコ幼虫における後部絹糸腺および脂肪体）であってもよく、複数の状態における単一の組織（たとえば、3齡期、4齡期、5齡期の各カイコ幼虫における後部絹糸腺）であってもよいものとする。無論、複数の状態における複数の組織であってもよい。なおカイコ組織は、カイコ組織の全体（たとえば、後部絹糸腺全体）である必要はない。

ここで、カイコ組織の「絹糸腺」とは、カイコ幼虫の両体側において、頭部の下唇先端に位置する吐出口から盲管にまで連なる一対の管状の外分泌腺であり、前部絹糸腺、中部絹糸腺および後部絹糸腺に大きく分けられる。後部絹糸腺は、絹糸の中心部を為すフィブロインを分泌する。また中部絹糸腺は、セリシンを分泌する。フィブロインは中部絹糸腺に蓄積されるとともに、セリシンによってその外周を覆われて、ゲル状の絹物質となる。この絹物質は、前部絹糸腺を通して吐出口から排出され、固体化して絹糸となる。

またカイコ組織の「脂肪体」とは、カイコ幼虫において、体内の至るところに分布し、白色の柔らかい扁平な帯状、ひも状あるいは葉状の組織である。脂肪体は、ヒトの肝臓に似て栄養、エネルギー源を貯蔵する役目を果たしているので、

虫由来の培養細胞（昆虫培養細胞）を使用するのが好ましい。昆虫培養細胞も、いかなる組織由来の細胞であってもよく、たとえば、血球細胞、生殖巣由来細胞、脂肪体由来細胞、胚由来細胞、孵化幼虫由来細胞などを特に制限なく使用することができるが、中でも、タンパク質生産能が高いと考えられる生殖巣由来の昆虫培養細胞を使用するのが好ましい。特に、細胞系においてタンパク質合成能が高く、また無血清培地にて培養が可能である、*Trichoplusia ni*の卵細胞由来の細胞High Five（Invitrogen社製）や*Spodoptera frugiperda*卵巣細胞由来の細胞Sf21（Invitrogen社製）が好適な昆虫培養細胞として例示される。

上記節足動物由来の抽出物を含有する無細胞系タンパク質合成用反応液は、従来公知の適宜の組成の抽出用液を用いて、節足動物の組織または培養細胞より抽出操作を行って得られた抽出液（無細胞系タンパク質合成用抽出液；抽出液＝抽出用液＋抽出物）を調製し、これに後述するような翻訳反応に要する成分、場合によっては翻訳反応および転写反応に要する成分を適宜添加することで、調製することができる。

節足動物からの抽出操作に用いられる抽出用液としては、特に制限されるものではないが、プロテアーゼインヒビターを少なくとも含有するのが好ましい。プロテアーゼインヒビターを含有する抽出用液を用いると、節足動物由来の抽出物に含有されるプロテアーゼの活性が阻害され、当該プロテアーゼによる抽出物中の活性タンパクの不所望な分解を防止でき、結果として節足動物由来の抽出物が有するタンパク質合成能を有効に引き出すことができるようになるという利点がある。上記プロテアーゼインヒビターとしては、プロテアーゼの活性を阻害し得るものであるならば特に制限はなく、たとえば、フェニルメタンサルホニルフルオリド（以下、「PMSF」ということがある。）、アプロチニン、ベスタチン、ロイペプチン、ペプスタチンA、E-64（L-trans-エポキシスクシニルロイシルアミド-4-グアニジノブタン）、エチレンジアミン四酢酸、ホスホラ

、塩化マグネシウム、クエン酸マグネシウム、リン酸水素マグネシウム、ヨウ化マグネシウム、乳酸マグネシウム、硝酸マグネシウム、シュウ酸マグネシウムなど一般的な形態で使うことができ、中でも酢酸マグネシウムを使うのが好ましい。マグネシウム塩も、タンパク質合成反応における補助因子として作用する。

当該抽出用液中におけるマグネシウム塩の含有量に特に制限はないが、保存安定性の観点から、たとえば酢酸マグネシウムなど2価の塩である場合、0.1 mM～10 mM含有されることが好ましく、0.5 mM～5 mM含有されることがより好ましい。マグネシウム塩が0.1 mM未満または10 mMを越えると、タンパク質の合成に必須な成分が不安定になる傾向にあるためである。

上記DTTは、酸化防止の目的で配合されるものであり、当該抽出用液中において0.1 mM～10 mM含有されることが好ましく、0.5 mM～5 mM含有されることがより好ましい。DTTが0.1 mM未満または10 mMを越えると、タンパク質の合成に必須な成分が不安定になる傾向にあるためである。

上記緩衝剤は、抽出用液に緩衝能を付与し、たとえば酸性または塩基性物質の添加などによって起こる抽出液のpHの急激な変化による抽出物の変性を防止する目的で配合される。このような緩衝剤としては特に制限はなく、たとえば、HEPES-KOH、Tris-HCl、酢酸-酢酸ナトリウム、クエン酸-クエン酸ナトリウム、リン酸、ホウ酸、MES、PIPESなどを使うことができる。

緩衝剤は、得られた抽出液のpHが4～10に保持されるようなものを使うのが好ましく、pHが6.5～8.5に保持されるようなものを使うのがより好ましい。抽出液のpHが4未満またはpHが10を越えると、本発明の反応に必須な成分が変性する虞があるためである。このような観点より、上記中でもHEPES-KOH (pH 6.5～8.5) を使うのが特に好ましい。

当該抽出用液中における緩衝剤の含有量に特に制限はないが、好適な緩衝能を

使用する組織量としては、特に制限はないが、通常、1 g ~ 100 g の範囲内である。

次に、摘出した組織を、たとえば液体窒素で凍結した後、-80℃で凍結させた乳鉢中ですり潰し、これに上述した抽出用液を添加して抽出操作を行う。

あるいは、上記抽出用液の添加後、一旦抽出用液も凍結させた後、シャーベット状になるまで（具体的には、ウェットな黄色いシャリシャリ状態の氷になるまで）、葉さじで攪拌しながら溶解する。その後、再度液体窒素で完全に凍結させた後、シャーベット状になるまで（具体的には、ウェットな黄色いシャリシャリ状態の氷になるまで）葉さじで攪拌しながら溶解させる。かかる方法によれば、タンパク質合成に関与する成分が効率的に抽出され且つ安定化されるという利点がある。

このようにして、まず、カイコの組織からの抽出物を含有する液状物を得る。

次に、上記抽出処理で得られた液状物を遠心分離にかける。該遠心分離は、当分野において通常行われている条件（10,000×g ~ 50,000×g、0℃ ~ 10℃、10分間 ~ 60分間）で行う。該遠心分離を1回行った後の上清（上清A1）をそのまま用いて抽出液とするようにしてもよいし、また、該上清A1に上記と同様の条件にて再度の遠心分離を行い、得られた上清（上清A2）を抽出液としてもよい。

また、上記上清A1と、上記1回目の遠心分離後の沈殿から上記抽出用液を用いてさらに抽出を行った後に、上記と同様の条件にて遠心分離して得られた上清（上清A3）とを混合して、抽出液として調製するようにしてもよい。このように上清A1と上清A3とを混合して抽出液を調製することで、上清A1、上清A3を単独で抽出液とする場合と比較して、タンパク質合成効率が向上するという利点がある。またさらに、上清A2を、上清A3と混合して抽出液を調製してもよい。これにより上記効果はさらに増強される。勿論、上記上清A1 ~ 上清A3を混合して、抽出液を調製するようにしてもよい。

昆虫培養細胞から抽出液を調製する場合、本発明者らが提案する、抽出用液中に懸濁した昆虫培養細胞を急激に凍結させる工程を少なくとも含有する方法によって調製するのが好ましい。ここで「急激に凍結」とは、凍結処理に付した後10秒以下、好ましくは2秒以下にて、昆虫培養細胞を凍結させることを指す。また昆虫培養細胞を急激に凍結させる温度としては、通常 -80°C 以下であり、好ましくは -150°C 以下である。上記昆虫培養細胞の急激な凍結は、たとえば、液体窒素や液体ヘリウムなどの不活性ガスを使用することなどによって実現できるが、入手が容易であり安価な液体窒素を用いて行うのが好ましい。

かかる方法によって昆虫培養細胞からの抽出を行うことにより、緩和な状態で細胞の破碎を行うことができ、無細胞系タンパク質合成に必須な成分を破壊することなく細胞外に取り出すことができ、従来よりもタンパク質の合成量の高い無細胞系タンパク質合成用抽出液を容易に調製することができる。さらに、使用器具などからのRNaseなどの混入も防ぐことができ、また、界面活性剤などの試薬を用いた細胞破碎法の場合に懸念される翻訳反応を阻害するような物質の持込みもない。

上記本発明者らが提案する抽出液の調製方法では、上述した急激に凍結させる工程を少なくとも含有しているならば、その他の工程について特に制限はない。たとえば、乳鉢中で乳棒を用いてすり潰す方法、ダウンスホモジナイザーを用いる方法、ガラスビーズを用いる方法など、大腸菌や小麦胚芽などから無細胞系タンパク質合成用抽出液を得る際に従来行われていた種々の手法にて昆虫培養細胞を破碎し、抽出を行えばよい。中でも、上記昆虫培養細胞を急激に凍結させた後、解凍し、遠心分離することによって昆虫培養細胞を破碎するのが好ましい。

上記急激に凍結した昆虫培養細胞を、解凍した後、遠心分離する場合、解凍は、たとえば -10°C ～ 20°C の水浴または氷水浴中での解凍、室温(25°C)にての放置などによって実現できるが、タンパク質合成に必須な成分の失活を防止し、タンパク質合成能の低下を確実に防ぐことから、 0°C ～ 20°C (特には、4

また上記ゲル濾過で得られた吸収の大きな画分を、さらに遠心分離にかけて、得られた上清（上清B3）を抽出液とするようにしてもよい。このゲル濾過後の遠心分離は、翻訳反応を阻害する不溶性の成分を除去するという理由から、 $30,000 \times g \sim 100,000 \times g$ 、 $0^{\circ}\text{C} \sim 10^{\circ}\text{C}$ 、10分間～60分間の条件で行うのが、好ましい。

なお、本発明の調製方法に供する昆虫培養細胞は、培養に用いる培地の翻訳反応液への持込みを避けるため、上記急激な凍結を行う前に、プロテアーゼインヒビターおよびグリセロールを含有しない以外は、上述した昆虫培養細胞用の好適な抽出用液と同じ組成の洗浄液にて予め洗浄しておくのが好ましい。洗浄液での洗浄は、昆虫培養細胞に洗浄液を添加し、これを遠心分離（たとえば、 $700 \times g$ 、10分間、 4°C という条件）することによって行う。洗浄に用いる洗浄液の量は、培地を完全に洗い流すという理由から、湿重量1gの昆虫培養細胞に対し5mL～100mLであるのが好ましく、10mL～50mLであるのがより好ましい。洗浄回数は、1回～5回行うのが好ましく、2回～4回行うのがより好ましい。

本発明の抽出液中における節足動物由来の抽出物の含有量に特に制限はないが、タンパク質濃度で $1\text{mg/mL} \sim 200\text{mg/mL}$ であるのが好ましく、中でも $10\text{mg/mL} \sim 100\text{mg/mL}$ であるのがより好ましい。当該抽出物の含有量がタンパク質濃度で 1mg/mL 未満であると、無細胞系タンパク質合成に必要な成分の濃度が低くなり、十分な合成反応が行えなくなる虞があるためであり、また当該抽出物の含有量がタンパク質濃度で 200mg/mL を越えると、抽出液自体が高い粘性を有し、操作しづらい虞があるためである。

なお上記範囲の量の節足動物由来の抽出物を含有する抽出液は、抽出液のタンパク質濃度測定を利用して、調製できる。当該タンパク質濃度測定は、当分野において通常行われているように、たとえばBCA Protein assay

る節足動物由来のミクロソーム膜を含む。かかる翻訳系用反応液を使用して翻訳系合成反応を行うことで、短時間で大量のタンパク質の合成が可能である。

翻訳系用反応液に含める翻訳鋳型 (mRNA) は、その塩基数に特に制限はなく、目的とするタンパク質を合成し得るならば mRNA 全てが同じ塩基数でなくともよい。また、目的とするタンパク質を合成し得る程度に相同な配列であれば、各 mRNA は、複数個の塩基が欠失、置換、挿入または付加されたものであってよい。mRNA は、従来公知の適宜の方法にて鋳型 DNA (その調製は例えば後述の通り) を転写して調製することができるが、自体公知のインビトロ転写によって鋳型 DNA を転写し、調製するのが好ましい。インビトロ転写は、たとえば Ribomax Large Scale RNA production System-T7 (プロメガ社製) などを利用して行うことができる。mRNA は、転写後、自体公知の方法にて精製して単離し、後述するように無細胞系タンパク質合成用の翻訳鋳型として、翻訳系用反応液に適用することができる。

翻訳系用反応液中において、翻訳鋳型は、タンパク質合成の速度の観点から、 $1 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 2000 \mu\text{g}/\text{mL}$ 含有されることが好ましく、 $10 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 1000 \mu\text{g}/\text{mL}$ 含有されることがより好ましい。mRNA が $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 未満または $2000 \mu\text{g}/\text{mL}$ を越えると、タンパク質合成の速度が低下する傾向にあるためである。

翻訳系用反応液中において、節足動物由来のミクロソーム膜は、タンパク質の翻訳後の修飾効率の観点から、 260 nm の吸光度 (以降 A_{260}) で $1 \sim 50$ ($A_{260} = 1 \sim 50$)、好ましくは $2 \sim 15$ ($A_{260} = 2 \sim 15$) 含有される。ミクロソーム膜が A_{260} で 1 未満では、翻訳後修飾が充分に行われたい傾向にあり、50 を越えるとタンパク質合成自体を顕著に阻害する傾向にあるためである。さらに、翻訳反応液中において mRNA 濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) と節足動物由来のミクロソーム膜濃度 (A_{260}) との比が $1 : 0.1 \sim 5$ 、好ましくは $0.3 \sim 2.3$ であることがタンパク質の翻訳後修飾効率の観点からいっそう好まし

mM～150mM含有されることがより好ましい。

翻訳系用反応液中におけるマグネシウム塩としては、抽出用液の成分として上述した各種のマグネシウム塩、好適には酢酸マグネシウム、を好ましく使用できる。マグネシウム塩は、上述した抽出用液におけるマグネシウム塩の場合と同様の観点から、当該翻訳系用反応液中において、0.1mM～10mM含有されることが好ましく、0.5mM～3mM含有されることがより好ましい。

翻訳系用反応液中におけるDTTは、上述した抽出用液におけるDTTの場合と同様の観点から、0.1mM～10mM含有されることが好ましく、0.2mM～5mM含有されることがより好ましい。

翻訳系用反応液中におけるアデノシン三リン酸（以下、「ATP」ということがある。）は、タンパク質合成の速度の観点から、0.01mM～10mM含有されることが好ましく、0.1mM～5mM含有されることがより好ましい。ATPが0.01mM未満または10mMを越えると、タンパク質の合成速度が低下する傾向にあるためである。

翻訳系用反応液中におけるグアノシン三リン酸（以下、「GTP」ということがある。）は、タンパク質合成の速度の観点から、0.01mM～10mM含有されることが好ましく、0.1mM～5mM含有されることがより好ましい。GTPが0.01mM未満または10mMを越えると、タンパク質合成の速度が低下する傾向にあるためである。

翻訳系用反応液中におけるクレアチンリン酸は、タンパク質を継続的に合成するための成分であって、ATPとGTPを再生する目的で配合される。クレアチンリン酸は、タンパク質合成の速度の観点から、当該反応液中において1mM～200mM含有されることが好ましく、10mM～100mM含有されることがより好ましい。クレアチンリン酸が1mM未満であると、十分な量のATPとGTPが再生されにくく、結果としてタンパク質の合成速度が低下する傾向にあるためであり、またクレアチンリン酸が200mMを越えると、阻害物質として働

るものであり、当該反応液中において $0.1 \text{ U}/\mu\text{L} \sim 100 \text{ U}/\mu\text{L}$ 含有されることが好ましく、 $1 \text{ U}/\mu\text{L} \sim 10 \text{ U}/\mu\text{L}$ 含有されることがより好ましい。RNaseインヒビターが $0.1 \text{ U}/\mu\text{L}$ 未満であると、RNaseの分解活性を充分抑えることができない傾向にあるためであり、またRNaseインヒビターが $100 \text{ U}/\mu\text{L}$ を越えると、タンパク質合成反応を阻害する傾向にあるためである。

翻訳系用反応液中におけるtRNAは、上記20種類のアミノ酸に対応した種類のtRNAを概ね等量ずつ含有してなる。本発明においては、タンパク質合成の速度の観点から、当該反応液中において $1 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 1000 \mu\text{g}/\text{mL}$ 含有されることが好ましく、 $10 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 500 \mu\text{g}/\text{mL}$ 含有されることがより好ましい。tRNAが $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 未満または $1000 \mu\text{g}/\text{mL}$ を越えると、タンパク質合成の速度が低下する傾向にあるためである。

翻訳系用反応液に含有される緩衝剤としては、上述した抽出用液に用いたものと同様のものが好適に使用でき、同様の理由から、HEPES-KOH (pH 6 ~ 8) を使用するのが好ましい。また、緩衝剤は、上述した抽出用液における緩衝剤の場合と同様の観点から、 $5 \text{ mM} \sim 200 \text{ mM}$ 含有されることが好ましく、 $10 \text{ mM} \sim 50 \text{ mM}$ 含有されることがより好ましい。

また翻訳系用反応液は、さらにグリセロールを添加されたものであるのがより好ましい。グリセロールを添加すると、翻訳系合成反応においてタンパク質合成に必須な成分を安定化できるという利点があるためである。グリセロールを添加する場合、通常、 $5 (\text{v}/\text{v}) \% \sim 20 (\text{v}/\text{v}) \%$ となるように添加する。

さらに、翻訳系用反応液は、エチレングリコールビス(2-アミノエチルエーテル)四酢酸(以下、「EGTA」ということがある。)を含有するのが好ましい。EGTAを含有すると、EGTAが抽出液中の金属イオンとキレートを形成することでリボヌクレアーゼ、プロテアーゼなどを不活化させることにより、無細胞系タンパク質合成に必須な成分の分解を阻害することができるためである。該

転写／翻訳系用反応液は、上記抽出液を除く成分として、転写鋳型、RNAポリメラーゼ、ATP、GTP、シチジン5'-三リン酸、ウリジン5'-三リン酸、クレアチンリン酸、クレアチンキナーゼ、アミノ酸成分およびtRNAを少なくとも含有するのが好ましく、本発明の目的である、タンパク質の翻訳後修飾の為には、ミクロソーム膜、より具体的には節足動物由来のミクロソーム膜を含む。かかる転写／翻訳系用反応液を使用して転写／翻訳系合成反応を行うことで、短時間で大量のタンパク質の合成が可能である。

なお転写鋳型（鋳型DNA）は、プロモーター配列およびタンパク質をコードする構造遺伝子を少なくとも有するものであれば、いかなる塩基配列、塩基数のものであってもよい。構造遺伝子がコードするタンパク質（ペプチドを含む）に特に制限はなく、生細胞で細胞毒となるタンパク質をコードする塩基配列を有するものであってもよいし、また糖タンパク質をコードする塩基配列を有するものであってもよい。鋳型DNAにおいて、通常、プロモーター配列は構造遺伝子の5'上流側に配置される。プロモーター配列としては、たとえば、従来公知のT7プロモーター配列、SP6プロモーター配列、T3プロモーター配列などが挙げられる。

また、本発明の鋳型DNAは、構造遺伝子の3'下流側にターミネーター配列を有するのが好ましい。上記ターミネーター配列としては、たとえば、従来公知のT7ターミネーター配列、SP6ターミネーター配列、T3ターミネーター配列などが挙げられる。また、鋳型DNAは、合成されたmRNAの安定性などの観点から、構造遺伝子の3'下流側にポリA配列を有していてもよい。

当該鋳型DNAは、(1)予め複数の領域に分割された鋳型DNAをライゲーションする工程と、(2)ライゲーション後のDNAをPCRによって増幅させる工程とを少なくとも含有する方法によって、合成されたものであってもよい。ここで、領域の数は、一連のライゲーション反応とその後のPCRによってつなぎ合わせて増幅させることが可能な領域は2つであり、さらに別の領域をつなぎ合わ

用いる。これにより、ライゲーションにより多種類のつなぎ合わされたDNAが生じるが、PCRによって所望のDNAのみが増幅される。

さらに、鑄型DNAが3つ以上の領域に分かれる場合は、上述のPCRで増幅したDNAとさらにつなぎ合わせたいDNAを用い、ライゲーション、PCRを行い、鑄型DNAを調製する。

また、本発明における鑄型DNAは、翻訳反応促進活性を有する配列（以下、「翻訳反応促進配列」ということがある。）をさらに有するのが好ましい。ここで「翻訳反応促進配列」とは、この翻訳反応促進配列を有する鑄型DNAを使用して無細胞系タンパク質合成反応を行うことで、この翻訳反応促進配列を有しない鑄型DNAを使用して無細胞系タンパク質合成反応を行った場合と比較して、翻訳効率が1.2倍以上（好適には、2倍以上）に向上される配列を指す。

かかる翻訳反応促進活性配列としては、上記のような翻訳反応促進活性を有する公知の配列を適宜使用することができ、特に制限されるものではない。翻訳反応促進活性配列の具体的な例としては、カイコまたはバキュロウイルスにおける5'非翻訳領域（5'UTR）として公知の塩基配列である。具体的には、カイコのフィブロインL鎖遺伝子の5'UTRの塩基配列、カイコのセリシン遺伝子の5'UTRの塩基配列、AcNPV (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*) のポリヘドリン遺伝子の5'UTRの塩基配列、BmCPV (*Bombyx mori cytoplasmic polyhedrosis virus*) のポリヘドリン遺伝子の5'UTRの塩基配列、EsCPV (*Euxoa scandes cytoplasmic polyhedrosis virus*) のポリヘドリン遺伝子の5'UTRの塩基配列、HcNPV (*Hyphantria cunea nuclear polyhedrosis virus*) のポリヘドリン遺伝子の5'UTRの塩基配列、CrNPV (*Choristoneura rosaceana nucleopolyhedrovirus*) のポリ

転写鑄型は、転写／翻訳系用反応液中において、 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 8000 \mu\text{g}/\text{mL}$ 含有されることが好ましく、 $3 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 600 \mu\text{g}/\text{mL}$ 含有されることがより好ましい。転写鑄型が $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 未満または $8000 \mu\text{g}/\text{mL}$ を越えると、タンパク質合成の速度が低下する傾向にあるためである。

転写／翻訳系用反応液中において、節足動物由来のミクロソーム膜は、タンパク質の翻訳後の修飾効率の観点から、A260で1～50 (A260=1～50)、好ましくは2～15 (A260=2～15) 含有される。ミクロソーム膜がA260で1未満では、翻訳後修飾が充分に行なわれない傾向にあり、50を越えるとタンパク質合成自体を顕著に阻害する傾向にあるためである。さらに、翻訳反応液中においてmRNA濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) と哺乳動物由来のミクロソーム膜の濃度 (A260) 比が1 : 0.1～5、好ましくは0.3～2.3であることがタンパク質の翻訳後の修飾効率の観点からいっそう好ましい。

節足動物由来ミクロソーム膜としては、上記翻訳系用反応液で用いたものと同様なものが、同様な調製方法にて利用できる。

転写／翻訳系用反応液に用いるRNAポリメラーゼは、転写鑄型が有するプロモーター配列に応じて適宜選択することができる。たとえば、転写鑄型がT7プロモーター配列を有している場合は、その配列を認識するT7 RNAポリメラーゼを使用することが好ましい。また転写鑄型が、SP6またはT3プロモーター配列を有している場合は、それぞれ、SP6 RNAポリメラーゼまたはT3 RNAポリメラーゼを使用することが好ましい。

RNAポリメラーゼは、mRNA合成の速度およびタンパク質合成の速度の観点から、転写／翻訳系用反応液中に $0.01 \text{U}/\mu\text{L} \sim 100 \text{U}/\mu\text{L}$ 含有されることが好ましく、 $0.1 \text{U}/\mu\text{L} \sim 10 \text{U}/\mu\text{L}$ 含有されることがより好ましい。RNAポリメラーゼが $0.01 \text{U}/\mu\text{L}$ 未満であると、mRNAの合成量が少なくなり、結果としてタンパク質合成の速度が低下する傾向にあるためであり、またRNAポリメラーゼが $100 \text{U}/\mu\text{L}$ を越えると、タンパク質合成反応を

阻害物質として働き、タンパク質の合成速度が低下する傾向にあるためである。

転写／翻訳系用反応液中におけるクレアチンキナーゼは、タンパク質を継続的に合成するための成分であって、クレアチンリン酸と共にATPとGTPを再生する目的で配合される。クレアチンキナーゼは、タンパク質合成の速度の観点から、転写／翻訳系用反応液中において $1\mu\text{g}/\text{mL} \sim 1000\mu\text{g}/\text{mL}$ 含有されることが好ましく、 $10\mu\text{g}/\text{mL} \sim 500\mu\text{g}/\text{mL}$ 含有されることがより好ましい。クレアチンキナーゼが $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満であると、十分な量のATPとGTPが再生されにくく、結果としてタンパク質の合成速度が低下する傾向にあるためであり、またクレアチンキナーゼが $1000\mu\text{g}/\text{mL}$ を越えると、阻害物質として働き、タンパク質の合成速度が低下する傾向にあるためである。

転写／翻訳系用反応液中におけるアミノ酸成分は、20種類のアミノ酸、すなわち、バリン、メチオニン、グルタミン酸、アラニン、ロイシン、フェニルアラニン、グリシン、プロリン、イソロイシン、トリプトファン、アスパラギン、セリン、トレオニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、チロシン、リシン、グルタミン、シスチン、アルギニン、の20種類のアミノ酸を少なくとも含有する。このアミノ酸には、ラジオアイソトープ標識されたアミノ酸も含まれる。さらに、必要に応じて、修飾アミノ酸を含有していてもよい。当該アミノ酸成分は、通常、各種類のアミノ酸を概ね等量ずつ含有してなる。

タンパク質合成の速度の観点からは、転写／翻訳系用反応液中において上記のアミノ酸成分が $1\mu\text{M} \sim 1000\mu\text{M}$ 含有されることが好ましく、 $10\mu\text{M} \sim 500\mu\text{M}$ 含有されることがより好ましい。アミノ酸成分が $1\mu\text{M}$ 未満または $1000\mu\text{M}$ を越えると、タンパク質の合成速度が低下する傾向にあるためである。

転写／翻訳系用反応液中におけるtRNAは、上記20種類のアミノ酸に対応した種類のtRNAを概ね等量ずつ含有してなる。tRNAは、タンパク質合成の速度の観点からは、転写／翻訳系用反応液中において $1\mu\text{g}/\text{mL} \sim 1000\mu\text{g}/\text{mL}$ 含有されることが好ましく、 $10\mu\text{g}/\text{mL} \sim 500\mu\text{g}/\text{mL}$ 含有

活性を充分抑えることができない傾向にあるためであり、またRNAseインヒビターが100U/ μ Lを越えると、タンパク質合成反応を阻害する傾向にあるためである。

上記スペルミジンは、転写における伸張反応を促進する目的で添加されるものであり、転写／翻訳系用反応液中において0.01mM～100mM含有されることが好ましく、0.05mM～10mM含有されることがより好ましい。スペルミジンが0.01mM未満であると、mRNAの合成速度が低下し生成するmRNAの量が少なくなり、結果としてタンパク質合成の速度が低下するというような傾向にあるためであり、またスペルミジンが100mMを越えると、タンパク質合成反応を阻害する傾向にあるためである。

転写／翻訳系用反応液に含有される緩衝剤としては、上述した抽出用液に用いたものと同様のものが好適に使用でき、同様の理由から、HEPES-KOH (pH 6～8)を使用するのが好ましい。また、緩衝剤は、上述した抽出用液における緩衝剤の場合と同様の観点から、1mM～200mM含有されることが好ましく、5mM～50mM含有されることがより好ましい。

また転写／翻訳系用反応液は、さらにグリセロールを添加されたものであるのがより好ましい。グリセロールを添加すると、転写／翻訳系合成反応においてタンパク質合成に必須な成分を安定化できるという利点があるためである。グリセロールを添加する場合、通常、5 (v/v) %～20 (v/v) %となるように添加する。

すなわち、転写／翻訳系用反応液としては、当該抽出液を30 (v/v) %～60 (v/v) %含有するとともに、さらに3 μ g/mL～600 μ g/mLの転写鋳型、転写／翻訳系用反応液中A260で1～50の哺乳動物ミクロソーム膜（最終的に翻訳鋳型との濃度比が、mRNA (μ g/mL) : ミクロソーム膜濃度 (A260) = 1 : 0.1～0.5となるような量)、0.1U/ μ L～10U/ μ LのRNAポリメラーゼ、0.1mM～5mMのATP、0.1mM～5m

、SDS-PAGE、免疫検定法などによって測定できる。翻訳後の修飾が適切に行われたか否かは、合成されたタンパク質をSDS-PAGE、フルオログラフィーに供与し、ミクロソーム膜存在下、非存在下での分子量の変化やプロテアーゼ処理に対する感受性から判定し得る。

実施例

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

〔実施例1〕

(1) 発現プラスミドの調製

翻訳後修飾の中でも糖鎖修飾（N-グリコシル化）をモデルとしてとらえ、糖鎖修飾が生じることが既に判明しているpro-TNF-GLC（タンパク質の成熟領域内にN-グリコシル化部位を人為的に導入した変異型のヒト抗腫瘍因子）を用い、この糖タンパク質のin vitroの合成を試みた。図1に構築した発現プラスミドの模式図を示した。また、用いるポリヘドリン5'-UTRの塩基配列を配列番号1に、pro-TNF-GLC遺伝子の全塩基配列を配列番号2に示した。

発現プラスミドの構築は、pT_NTベクター（プロメガ社製）を鋳型として、配列番号3および4に塩基配列を示した末端にBamHIサイト付加したPCRプライマーを用い、BamHI消化後にセルフライゲーションを行うことによって、マルチクロニングサイトのXhoIサイトの前にBamHIサイトを導入した。更に配列番号5および6に塩基配列を示したPCRプライマーを用いてPCRを行い、HindIII消化後にセルフライゲーションを行うことによって、pT_NTベクターにもともと存在しているT7ターミネーター配列直後のBamHIサイトをHindIIIサイトに変更した。次に、PCRによって、Ba

全てのPCRの条件は、KOD-plus (TOYOBO社製) を用いて、96℃2分で鑄型DNAを変性させた後、96℃15秒、50℃30秒、68℃5分のサイクル反応を30回行った。

構築したプラスミドの塩基配列はDNA250ngを鑄型としてBig Dye Terminator Cycle Sequence FS Ready Reaction Kit (ABI社製) を用いてPCR (96℃10秒、50℃5秒、60℃4分、25サイクル) を行い、反応液をABI PRISM 310 Genetic Analyzer (ABI社製) で解析した。

全てのライゲーションサンプルは、Ligation High (TOYOBO社製) を用いてライゲーションを行った後、大腸菌DH5 α (TOYOBO社製) に形質転換し、形質転換後の大腸菌からアルカリ-SDS法によりプラスミドを調製し、DNA塩基配列の解析を行った。

(2) *in vitro* 転写反応およびmRNAの精製

上記(1)で調製したプラスミドをHindIIIで消化した後、フェノール-クロロホルム抽出、エタノール沈殿により精製した。得られたDNA1 μ gを鑄型として、RiboMax Large Scale RNA Production System-T7 (プロメガ社製) を用いて、20 μ lスケールで37℃4時間、mRNA合成を行った。反応後、1UのRQ1 RNase Free DNase (プロメガ社製) を添加し、37℃15分インキュベートし、鑄型DNAを消化した。フェノール-クロロホルム抽出によりタンパク質を除去した後、エタノール沈殿を行った。得られた沈殿を100 μ lの滅菌水に溶解し、Nick column (アマシャム社製) で精製した後、再度エタノール沈殿を行い、最終的にA260/A280=1.8~2.0、RNA濃度が2mg/mlとなるように滅菌水に溶解した。このようにして調製したmRNAは無細胞系タンパク質合成にそのまま使用した。転写用プラスミド-Iから転写したものをmRNA-I、転写用プラスミド-IIから転写したものをmRNA-II

40mM HEPES-KOH (pH 7.9)、100mM KOAc、1.5mM Mg(OAc)₂、0.1mM EGTA、250mM シュクロース、2mM DTT、0.5mM PMSF

懸濁後、きつく合せられたダウンスホモジナイザー (Dounce homogenizer) を20回往復することにより、細胞を破碎した。破碎後、1000×g、4℃、10分間遠心分離して細胞残渣を取り除き、上清を回収した。この上清からシュクロースの密度勾配による超遠心分離でミクロソーム膜画分を分離した。超遠心分離の際、容器の下から順に1.3Mのシュクロースを含む抽出用液と先程回収した上清を1:3の体積比 (v/v) で満たした。このサンプルを140000×g、4℃、2時間半超遠心分離 (HITACHI社製超遠心分離機CP80MXとスイングローターP40STを用いた) した。超遠心分離後、上清を全て破棄し、沈殿をスタート時の細胞湿重量1gあたり100μlの抽出用液で静かに懸濁し、これをミクロソーム膜とした。このミクロソーム膜のA260/A280は1.4~1.5、A260は約150であった。

(4) 無細胞系タンパク質合成

(4-1) 節足動物由来の抽出物を含有する無細胞系タンパク質合成用抽出液による無細胞系タンパク質合成

上記(2)で調製したpro-TNF GLCのmRNA-1、および上記(3)で調製したミクロソーム膜を用いて、節足動物由来の抽出物を含有する無細胞系タンパク質合成用抽出液による無細胞系タンパク質合成を行った。

(カイコ抽出液の調製)

5齢期4日目のカイコ幼虫15匹よりハサミ、ピンセット、メス、スパーテルを使用して、後部絹糸腺3.07gを摘出し、これを-80℃で凍結させた乳鉢ですり潰し、下記組成の抽出用液を用いて、抽出を行った。

[抽出用液の組成]

・20mM HEPES-KOH (pH 7.4)

gen社製)を、L-グルタミンを添加したExpress Five無血清培地(Invitrogen社製)を入れた培養フラスコ(600cm²)内で27℃で6日間培養した。結果、細胞数 1.0×10^8 個、湿重量1.21gとなった。

次いで上記培養した昆虫培養細胞を集め、下記組成の洗浄液で3回洗浄(700×g、4℃、10分間の条件で遠心分離)した。

〔洗浄液の組成〕

- ・ 60mM HEPES-KOH (pH7.9)
- ・ 200mM 酢酸カリウム
- ・ 4mM 酢酸マグネシウム
- ・ 4mM DTT

洗浄後の昆虫培養細胞に、下記組成の抽出用液を1mL加え、懸濁した。

〔抽出用液の組成〕

- ・ 40mM HEPES-KOH (pH7.9)
- ・ 100mM 酢酸カリウム
- ・ 2mM 酢酸マグネシウム
- ・ 2mM 塩化カルシウム
- ・ 20 (v/v) % グリセロール
- ・ 1mM DTT
- ・ 1mM PMSF

この懸濁液を液体窒素中にて急速に凍結させた。十分に凍結させた後、約4℃の氷水浴中で解凍した。完全に解凍した後、30,000×g、4℃で10分間遠心分離(himac CR20B3、日立工機社製)し、上清を回収した。回収した上清1.5mLを下記組成のゲル濾過用緩衝液で平衡化したPD-10脱塩カラム(アマシャム バイオサイエンス社製)にアプライした。

〔ゲル濾過用緩衝液の組成〕

- ・ 40 mM HEPES-KOH (pH 7.9)
- ・ 100 mM 酢酸カリウム
- ・ 2 mM 酢酸マグネシウム
- ・ 2 mM 塩化カルシウム
- ・ 20% (v/v) グリセロール
- ・ 1 mM DTT
- ・ 0.5 mM PMSF

この細胞懸濁液を液体窒素中にて急速に凍結させた。十分に凍結させた後、約 4℃の氷水浴中で解凍した。完全に解凍した後、30000×g、4℃で10分間遠心分離 (himac CR20B3、日立工機社製) し、上清1Aを回収した。回収した上清1Aをさらに45000×g、4℃で30分間遠心分離 (himac CR20B3、日立工機社製) して上清1Bを回収した。回収した上清1Bを下記組成のゲル濾過用緩衝液で平衡化したPD-10脱塩カラム (アマシャム バイオサイエンス社製) に2.5 mL アプライした

〔ゲル濾過用緩衝液の組成〕

- ・ 40 mM HEPES-KOH (pH 7.9)
- ・ 100 mM 酢酸カリウム
- ・ 2 mM 酢酸マグネシウム
- ・ 1 mM DTT
- ・ 0.5 mM PMSF

アプライした後、ゲル濾過用緩衝液3 mLにて溶出し、分光光度計 (Ultraviolet spec 3300 pro、アマシャム バイオサイエンス社製) を用いて、280 nmにおける吸光度が30以上の画分を回収し、これを昆虫細胞抽出液とした。

カイコ後部絹糸腺由来抽出液、昆虫培養細胞 (High Five、Sf21

イックス社製)をそれぞれ用いた。

反応装置として低温アルミブロック恒温槽MG-1000(東京理化器械社製)を用いた。翻訳反応は反応温度25℃で6時間行い、反応液量は25μLとした。

昆虫培養細胞由来抽出液を用いた合成

(1) High Five 由来抽出液を用いた場合

- ・ 昆虫由来ミクロソーム膜 (反応液1μL中A260=0~50)
- ・ 50(v/v)% 節足動物由来 (High Five 由来) 抽出液
- ・ 320μg/mL mRNA
- ・ 40mM HEPES-KOH (pH7.9)
- ・ 100mM 酢酸カリウム
- ・ 2mM 酢酸マグネシウム
- ・ 2mM DTT
- ・ 10(v/v)% グリセロール
- ・ 0.5mM ATP
- ・ 0.25mM GTP
- ・ 20mM クレアチンリン酸
- ・ 200μg/mL クレアチンキナーゼ
- ・ 80μM アミノ酸 (20種)
- ・ 0.25mM EGTA
- ・ 1U/μL RNaseインヒビター
- ・ 200μg/mL tRNA

ATP (シグマ社製)、GTP (シグマ社製)、アミノ酸 (20種) (シグマ社製)、RNaseインヒビター (宝酒造社製)、tRNA (ロシュ・ダイアグノスティックス社製)をそれぞれ用いた。

反応装置として低温アルミブロック恒温槽MG-1000(東京理化器械社製

胞系タンパク質合成

上記(2)で調製したpro-TNF GLCのmRNA-I I、および上記(3)で調製したミクロソーム膜を用いて、ウサギ網状赤血球抽出液(RRL; プロメガ社製)による無細胞系タンパク質合成を行った。また、この時それぞれの反応開始時に、上記(3)で調製したミクロソーム膜を種々の濃度添加して、共反応させることによりタンパク質のグリコシル化を行った。

- ・ 翻訳系反応液中A260=0~50のミクロソーム膜
- ・ 50 (v/v) % ウサギ網状赤血球抽出液 17.5 μ l
- ・ 2mg/mL mRNA 2 μ l
- ・ 40U/ μ L RNaseインヒビター 1 μ l
- ・ 1mM アミノ酸(20種) 1 μ l

アミノ酸(20種)はシグマ社製のものを、RNaseインヒビターは宝酒造社製のものをそれぞれ用いた。

反応装置として低温アルミブロック恒温槽MG-1000(東京理化器械社製)を用いた。翻訳反応は反応温度30℃で90分間行い、反応液量は25 μ Lとした。

(5) 上記(4)の無細胞系タンパク質合成により合成した翻訳反応産物の脱糖鎖

上記(4)で合成したN-グリコシル化タンパク質(pro-TNF GLC)が糖鎖修飾された糖タンパク質であることを確認するために、N型糖鎖分解酵素で脱糖鎖化を行った。N型糖鎖分解酵素としてグリコペプチダーゼF(TAKARA社製)を用い、これを翻訳反応終了後の反応液10 μ lあたり1 μ l添加し、25℃で2時間反応させた。

(6) N-グリコシル化タンパク質の検出

N-グリコシル化タンパク質の検出は、抗TNF抗体(R&D社製)を用いたウェスタンブロット法とECL-plus(アマシャム社製)による化学発光を

。 図2において、上段はカイコ後部絹糸腺由来抽出液(BML)、中段は昆虫培養細胞High Five抽出液(HFL)、昆虫培養細胞Sf21細胞抽出液(Sf21L)を用いてミクロソーム膜存在下で翻訳を行った結果を示した。添加したミクロソーム膜は左から犬膀胱ミクロソーム膜(CMM、プロメガ社製)、昆虫培養細胞High Five由来ミクロソーム膜(HFMM)、昆虫培養細胞Sf21由来ミクロソーム膜(Sf21MM)をそれぞれ添加し、翻訳と共反応したものである。ミクロソーム膜の添加量は、A260の値で示してある。

これらの結果から、BML、HFL、Sf21Lの全ての抽出液において、HFMMおよびSf21MMをそれぞれ添加した場合に、犬膀胱ミクロソーム膜添加時よりも効率良いN-グリコシル化が生じることが判明した。また、このシフトバンドはグリコペプチダーゼF消化により顕著に減少したことから、N型糖鎖付加タンパク質であることが確認できた。

以上から、昆虫由来抽出液に昆虫由来ミクロソーム膜を添加することで、効率よいタンパク質の糖鎖修飾が可能であることが示された。

同様に図3において、ウサギ網状赤血球抽出液を用いて、ミクロソーム膜存在下で翻訳を行った結果を示した。添加したミクロソーム膜は左から昆虫培養細胞High Five由来ミクロソーム膜(HFMM)、昆虫培養細胞Sf21由来ミクロソーム膜(Sf21MM)である。それぞれ添加した場合に効率良いN-グリコシル化が生じることが判明した。また、このシフトバンドはグリコペプチダーゼF消化により顕著に減少したことから、N型糖鎖付加タンパク質であることが確認できた。

以上から、ウサギ網状赤血球抽出液においても、昆虫由来ミクロソーム膜を添加することで、効率よいタンパク質の糖鎖修飾が可能であることが示された。

なお、配列表における人工配列(Artificial Sequence)を説明するフリーテキスト

請 求 の 範 囲

1. 無細胞系タンパク質合成用抽出液を用いる無細胞系でのタンパク質合成方法であって、翻訳反応を節足動物由来のミクロソーム膜の存在下で行うことを含む方法。
2. mRNA濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) と節足動物由来のミクロソーム膜の濃度 (A260) との比が 1 : 0.1 ~ 5 で翻訳反応を行う請求の範囲第1項に記載の方法。
3. 当該比が 1 : 0.3 ~ 2.3 である、請求の範囲第2項に記載の方法。
4. 節足動物由来のミクロソーム膜が昆虫組織から抽出されたものである、請求の範囲第1項に記載の方法。
5. 昆虫組織がカイコ組織である、請求の範囲第4項に記載の方法。
6. カイコ組織が脂肪体である、請求の範囲第5項に記載の方法。
7. 節足動物由来のミクロソーム膜が昆虫培養細胞から抽出されたものである、請求の範囲第1項に記載の方法。
8. 昆虫培養細胞が *Trichoplusia ni* 卵細胞由来あるいは *Spodoptera frugiperda* 卵巣細胞由来の培養細胞である、請求の範囲第7項に記載の方法。
9. 無細胞系タンパク質合成用抽出液が、節足動物由来の抽出物を含有するものである、請求の範囲第1項に記載の方法。
10. 節足動物由来の抽出物が昆虫組織から抽出されたものである、請求の範囲第9項に記載の方法。
11. 昆虫組織がカイコ組織である、請求の範囲第10項に記載の方法。
12. カイコ組織がカイコ幼虫の後部絹糸腺を少なくとも含有する、請求の範囲第11項に記載の方法。

25. カイコ組織が脂肪体である、請求の範囲第24項に記載の方法。

26. 節足動物由来のミクロソーム膜が昆虫培養細胞から抽出されたものである、請求の範囲第20項に記載の方法。

27. 昆虫培養細胞が *Trichoplusia ni* 卵細胞由来あるいは *Spodoptera frugiperda* 卵巣細胞由来の培養細胞である、請求の範囲第26項に記載の方法。

28. 無細胞系タンパク質合成用抽出液が、節足動物由来の抽出物を含有するものである、請求の範囲第20項に記載の方法。

29. 節足動物由来の抽出物が昆虫組織から抽出されたものである、請求の範囲第28項に記載の方法。

30. 昆虫組織がカイコ組織である、請求の範囲第29項に記載の方法。

31. カイコ組織がカイコ幼虫の後部絹糸腺を少なくとも含有する、請求の範囲第30項に記載の方法。

32. 節足動物由来の抽出物が昆虫培養細胞から抽出されたものである、請求の範囲第28項に記載の方法。

33. 昆虫培養細胞が *Trichoplusia ni* 卵細胞由来あるいは *Spodoptera frugiperda* 卵巣細胞由来の培養細胞である、請求の範囲第32項に記載の方法。

34. 無細胞系タンパク質合成用抽出液が、小麦胚芽由来の抽出物を含有するものである、請求の範囲第20項に記載の方法。

35. 無細胞系タンパク質合成用抽出液が、哺乳動物培養細胞由来の抽出物を含有するものである、請求の範囲第20項に記載の方法。

36. 無細胞系タンパク質合成用抽出液が、ウサギ網状赤血球由来の抽出物を含有するものである、請求の範囲第20項に記載の方法。

37. 無細胞系タンパク質合成用抽出液が、大腸菌由来の抽出物を含有するものである、請求の範囲第20項に記載の方法。

図 1

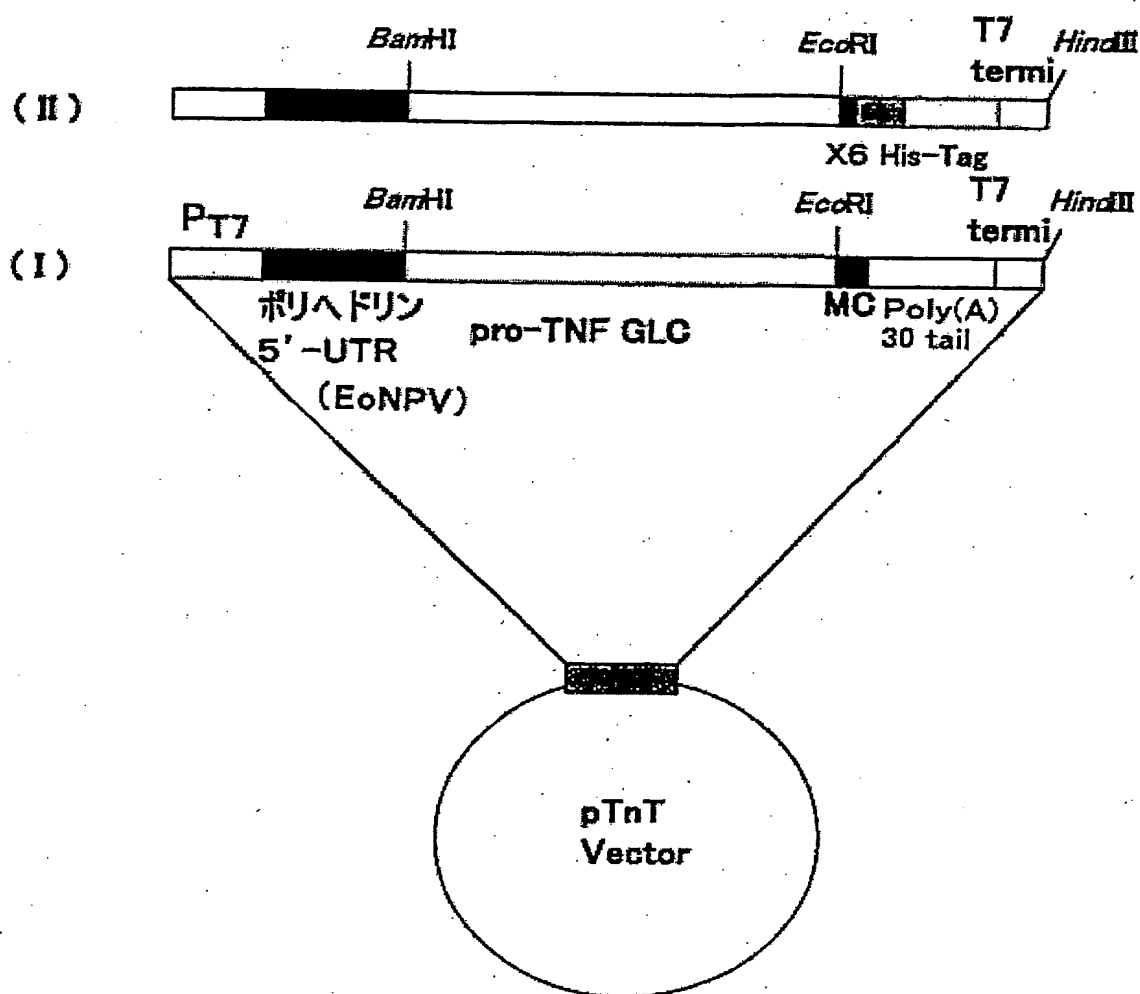
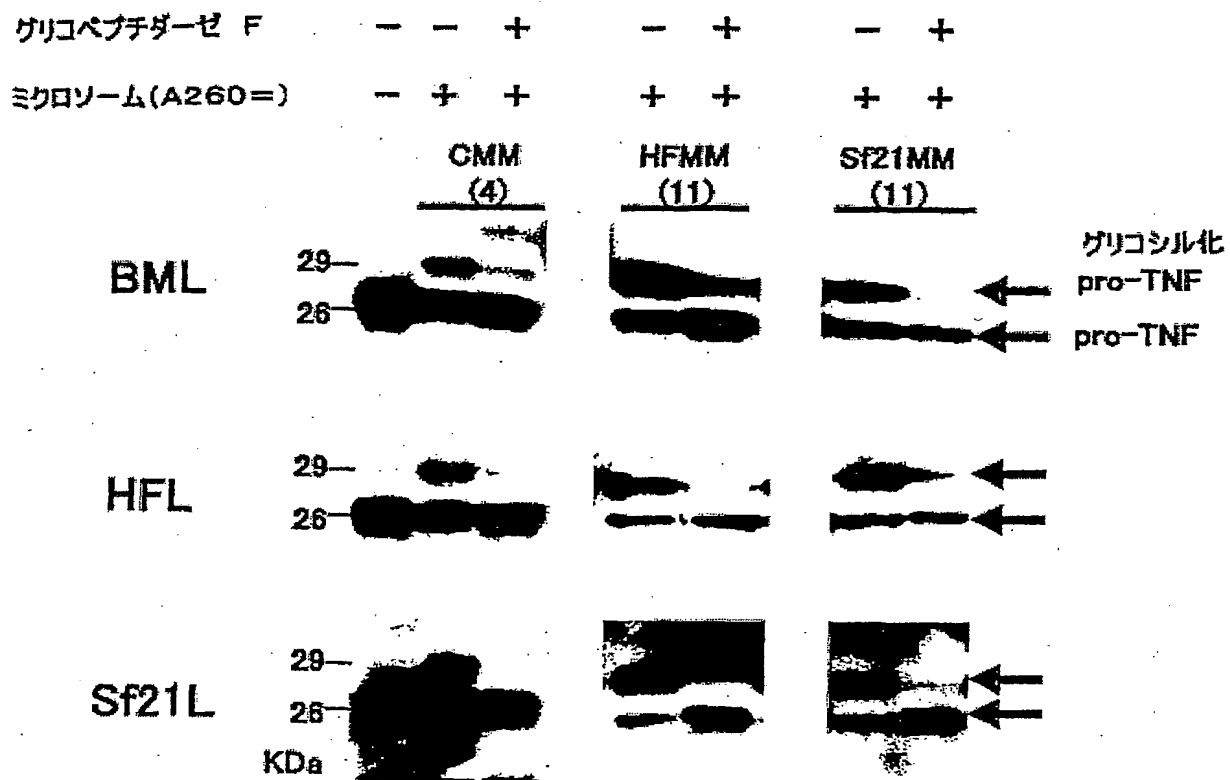


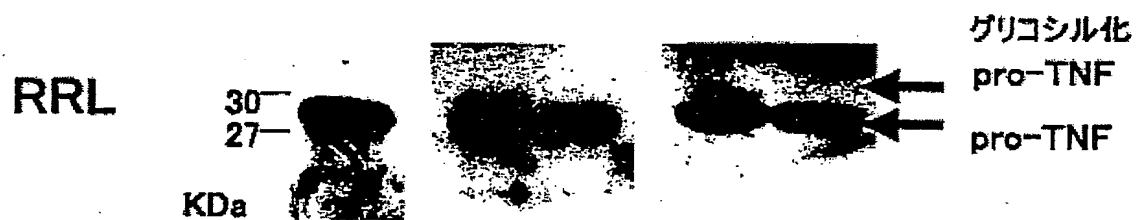
図 2



3 / 3

図 3

グリコペプチダーゼ F	-	-	+	-	+
ミクロソーム(A260=)	-	+	+	+	+
		HFMM (15)		Sf21MM (15)	



SEQUENCE LISTING

<110> SHIMADZU CORPORATION, National University Corporation Yamaguchi University

<120> Method of posttranslational modification by addition of microsome membrane in cell-free protein synthesis

<130> G104090W0

<150> JP 2003-384387

<151> 2003-11-13

<160> 9

<210> 1

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 5' UTR (EoNPV polyhedrin gene)

<400> 1

agtattgtag tcctttcgtg attgtttgtg aaatctaaaa tacaccgta 49

<210> 2

<211> 702

<212> DNA

<213> homo sapience

<220>

<223> pro-TNF GLC

<400> 2

atgagcactg aaagcatgat ccgggacgtg gagctggccg aggaggcgt cccaagaag	60
acaggggggc ccaggggtc caggcgggtg ttgttctca gctcttctc cttcctgac	120
gtggcaggcg ccaccacgt cttctgcctg ctgcacttg gagtgatcg ccccagagg	180
gaagagtccc ccagggacct ctctctaata agccctctgg ccagggcagt cagatcatct	240
tctcgaaccc cgagtgaaca gctgtagcc catgttgtag caaacctca agctgagggg	300
cagctccagt ggctgaaccg ccggggcaat gccctcctgg ccaatggcgt ggagctgaga	360
gataaccagc tgggtgggtg atcagagggc ctgtacctca tctactcca ggtcctcttc	420
aaggggcaag gctgccctc caccatgtg ctctcacc acaccatcag ccgcatcgcc	480
gtctcctacc agaccaagg caacctctc totgocatca agagccctg ccagagggag	540

3 / 3

<220>

<223> PCR primer

<400> 6

aaaaagcttc ccctggcgta a 21

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> His-Tag coding DNA

<400> 7

ccaccaccac caccaccact ga 22

<210> 8

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 8

cgggatccat gagcactgaa agcatg 26

<210> 9

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 9

cggaattcca gggcaatgat cccaaa 26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/017219

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12P21/02, C07K14/00, C12N15/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12P21/02, C07K14/00, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus (JOIS), BIOSIS/WPI (DIALOG), SwissProt/PIR/GeneSeq,
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u>	Gillies S. et al., Translation of vesicular stomatitis and Sindbis virus mRNAs in cell-free extracts of Aedes albopictus cells, J.Biol. Chem., 1981, Vol.256, No.24 pages 13188-92	1-4, 9-10, 20-23, 28-29, 39 <u>11-19, 30-38</u> 5-8, 24-27, 40
<u>Y</u> A		
<u>Y</u> A	Davis J.W., Cell-free protein synthesizing systems isolated from an insect cell line, Insect Biochem., 1977, Vol.7, pages 77 to 83	1-4, 9-23, 28-39 <u>5-8, 24-27, 40</u>
<u>Y</u> A	JP 2003-235598 A (Rengo Co., Ltd.), 26 August, 2003 (26.08.03), Full text (Family: none)	1-4, 9-14, 20-23, 28-33, 39 <u>5-8, 15-19,</u> 24-27, 34-38, 40

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
07 January, 2005 (07.01.05)Date of mailing of the international search report
25 January, 2005 (25.01.05)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/017219

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	JP 62-500631 A (Shitas Corp.), 19 March, 1987 (19.03.87), Full text & WO 86/02381 A1	<u>40</u> 1-39

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP20 04/017219

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet(2)

The substance as set forth in claim 41 is specified as "a protein from which a signal sequence has been cleaved and which is obtained by the protein synthesis method as set forth in claim 1" and, therefore, involves any proteins from which a signal sequence has been cleaved and which is obtained by this synthesis method.

However, nothing is specifically disclosed in the description as a protein from which a signal sequence has been cleaved and which is obtained by this synthesis method. Thus, claim 41 is neither supported by the description nor disclosed therein. Even though the common technical knowledge at the point of the application is considered, it is completely unknown what specific substances are involved in the scope thereof and what are not. Thus, claim 41 is described in an extremely unclear manner.

Such being the case, no meaningful search can be made on the invention as set forth in claim 41.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. ⁷ C12P21/02, C07K14/00, C12N15/09		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. ⁷ C12P21/02, C07K14/00, C12N15/09		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus (JOIS) BIOSIS/WPI (DIALOG) SwissProt/PIR/GeneSeq Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> <u>Y</u> A	Gillies S. et al., Translation of vesicular stomatitis and Sindbis virus mRNAs in cell-free extracts of Aedes albopictus cells, J. Biol. Chem., 1981, Vol. 256, No. 24, pages 13188-92	1-4, 9-10, 20-23, 28-29, 39 <hr/> 11-19, 30-38 5-8, 24-27, 40
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 07. 01. 2005	国際調査報告の発送日 25. 1. 2005	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 鈴木 恵理子	4 N 3 1 2 6
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

C (続き) . . . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>Y</u> A	WO 00/50586 A2 (European Molecular Biology Laboratory) 2000.08.31, 全文 (ファミリーなし)	1-4, 9-14, 20-23, 28-33, 39 5-8, 15-19, 24-27, 34-38, 40
<u>Y</u> A	Shields D. et al., Efficient cleavage and segregation of nascent presecretory proteins in a reticulocyte lysate supplemented with microsomal membranes, J. Biol. Chem., 1978, Vol.253, No.11, pages 3753-6	1-4, 9-23, 28-39 5-8, 24-27, 40
<u>Y</u> A	Walter P. et al., Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein, J. Cell. Biol., 1981, Vol.91(2 Pt 1) pages 545-50	1-4, 9-23, 28-39 5-8, 24-27, 40
<u>Y</u> A	JP 2000-175695 A (理化学研究所) 2000.06.27, 全文 & EP 1143009 A1 & WO 00/36133 A1	1-4, 15-23, 34-39 5-14, 24-33, 40
<u>X</u> A	JP 62-500631 A (シタス コーポレイション) 1987.03.19, 全文 & WO 86/02381 A1	40 1-39

(第1 ページ第Ⅱ欄2. より続く)

請求の範囲41に記載の物質は、「請求の範囲第1項に記載のタンパク質合成方法によって得られた、シグナル配列が切除されたタンパク質」と特定されており、当該合成方法で得られる、シグナル配列が切除されたあらゆるタンパク質を包含するものである。

しかしながら、明細書には、当該合成方法で得られる、シグナル配列が切除されたタンパク質として具体的なものが一切記載されていないから、請求の範囲41は、明細書による裏付けを欠き、開示も欠いている。また、出願時の技術常識を勘案しても、具体的にどのような物質が包含され、どのような物質が包含されないのかが全く不明であって、請求の範囲41の記載は著しく不明確である。

したがって、請求の範囲41に記載された発明について有意義な調査をすることができない。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.